

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : A61K 7/48, 7/06, 7/28		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/07770 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. März 1997 (06.03.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/03589 (22) Internationales Anmeldedatum: 14. August 1996 (14.08.96)		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 195 30 816.6 23. August 1995 (23.08.95) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN [DE/DE]; Henkelstrasse 67, D-40589 Düsseldorf (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEISS, Albrecht [DE/DE]; Forellenvog 37, D-40764 Langenfeld (DE). MAURER, Karl-Heinz [DE/DE]; Dechenstrasse 5, D-40699 Erkrath (DE).			
(54) Title: USE OF MUTATED SUBTILISIN PROTEASE IN COSMETIC PRODUCTS			
(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON MUTIERTER SUBTILISIN-PROTEASE IN KOSMETISCHEN PRODUKTEN			
(57) Abstract			
A mutated subtilisin-type protease that bears at least one mutation in its amino-acid sequence that causes the positive charge to be reduced or the negative charge to be increased in the substrate binding region of the molecule is used in cosmetic products. Such proteases show a surprisingly low skin and mucous membrane irritating potential.			
(57) Zusammenfassung			
Es wird die Verwendung von mutierter Protease vom Subtilisin-Typ, die mindestens eine Mutation in ihrer Aminosäure-Sequenz trägt, die zu einer reduzierten positiven Ladung oder einer erhöhten negativen Ladung in der Substrat-Bindungsregion des Moleküls führt, in kosmetischen Produkten beansprucht. Derartige Proteasen zeigen ein überraschend geringes Irritationspotential gegenüber der Haut und Schleimhäuten.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verwendung von mutierter Subtilisin-Protease in kosmetischen Produkten

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von mutierten proteolytischen Enzymen mit geringem Irritationspotential gegenüber der Haut, nämlich mutierten Subtilisin-Proteasen, in kosmetischen Produkten, insbesondere Körperreinigungs- und -pflegemitteln sowie Mundpflegemitteln.

Enzyme wie Proteasen, Lipasen, Amylasen und Cellulasen werden seit langem in Wasch- und Reinigungsmitteln im wesentlichen zur Unterstützung der Wasch- und Reinigungsleistung verwendet. Unter diesen Enzymen nehmen Proteasen eine herausragend wichtige Stellung ein.

Proteasen sind Enzyme, welche die Hydrolyse von Peptidbindungen in Protein- und Peptidsubstraten und von Esterbindungen in einigen endständigen Estern katalysieren. Subtilisine sind eine Familie von bakteriellen, extracellulären Proteasen mit Molekulargewichten von etwa 20 000 bis 45 000 Dalton, die aus Bodenbakterien, zum Beispiel *Bacillus amyloliquefaciens*, erhalten werden können. Subtilisine gehören zur Gruppe der Serin-Proteasen, die den nucleophilen Angriff auf die Peptid-(Ester-) Bindung über einen Serin-Rest an der aktiven Stelle initiieren. Sie sind physikalisch und chemisch gut charakterisierte Enzyme. Die dreidimensionale Struktur von einigen Subtilisinen wurde im einzelnen durch Röntgen-Beugungsaufnahmen aufgeklärt (C. Betzel, G.P. Pal und W. Saenger, (1988) Eur. J. Biochem. 178, 155-171; R. Bott, M. Ultsch, A. Kossiakoff, T. Graycar, B. Katz und S. Power, (1988) J. Biol. Chem. 263, 7895-7906; D.W. Goddette, C. Paech, S.S. Yang, J.R. Mielenz, C. Bystroff, M. Wilke und R.J. Fletterick, (1992) J. Mol. Biol. 228, 580-595; D.W. Heinz, J.P. Priestle, J. Rahuel, K.S. Wilson und M.G. Grüter (1991) J. Mol. Biol. 217, 353-371; J. Kraut (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 331-358; D.J. Neidhart und G.A. Petsko (1988) Protein Eng. 2, 271-276; A.V. Teplyakov, I.P. Kuranova, E.H. Harutyunyan, B.K. Vainshtein, C. Frömmel, W.-E. Höhne und K.S. Wilson (1990) J. Mol. Biol. 214, 261-279).

Subtilisine werden in großem Umfang in handelsüblichen Produkten, wie zum Beispiel in Wasch- und Geschirrspülmitteln sowie Kontaktlinsen-Reinigungsmitteln, und in der synthetischen organischen Chemie, dort allerdings in erster Linie für Forschungszwecke,

eingesetzt. Ein Mitglied der Subtilisinfamilie, nämlich eine hoch alkalische Protease, die in tensidhaltigen Mitteln verwendet werden kann, wurde in der internationalen Patentammlung WO 91/02792 beschrieben. Diese alkalische Protease aus *Bacillus lentus* (*Bacillus lentus* alkaline protease; BLAP) kann in kommerziell verwertbaren Mengen aus dem Stamm-*Bacillus licheniformis* ATCC 53926 erhalten werden, welcher ein Expressionsplasmid trägt, welches das BLAP-Gen unter der Kontrolle des Promoters der alkalischen Protease von *Bacillus licheniformis* ATCC 53926 exprimiert. Die Kristallstruktur von BLAP ist bestimmt worden (D.W. Goddette et al. (1992) J. Mol. Biol. 228, 580-595; WO 92/21760) und die Koordinaten wurden bei der Brookhaven Protein Datenbank hinterlegt. Wenn man eine optimale Sequenzhomologie von BLAP (269 Aminosäuren) mit der von Subtilisin BPN' (275 Aminosäuren) abgleicht, erhält man folgendes Muster: Die BLAP Positionen 1 bis 35, 36 bis 54, 55 bis 160 und 161 bis 269 entsprechen den Positionen 1 bis 35, 37 bis 55, 57 bis 162 bzw. 167 bis 275 in Subtilisin BPN'. Wenn nicht anders angegeben, entspricht die hier verwendete Numerierung der Aminosäuren der von BLAP.

Um die Protease-Varianten zu beschreiben, die in der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden, wird die folgende Nomenklatur verwendet: [ursprüngliche Aminosäure; Position vom N-Terminus des reifen Enzyms; substituierte Aminosäure]. Zum Beispiel wird der Austausch von Valin durch Isoleucin in der Position 4 im BLAP als V4I bezeichnet. Die Liste der üblichen Abkürzungen für die gebräuchlichen Aminosäuren ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Abkürzung der Aminosäuren

A	=	Ala	=	Alanin
C	=	Cys	=	Cystein
D	=	Asp	=	Asparaginsäure
E	=	Glu	=	Glutaminsäure
F	=	Phe	=	Phenylalanin
G	=	Gly	=	Glycin
H	=	His	=	Histidin
I	=	Ile	=	Isoleucin

K	=	Lys	=	Lysin
L	=	Leu	=	Leucin
M	=	Met	=	Methionin
N	=	Asn	=	Asparagin
P	=	Pro	=	Prolin
Q	=	Gin	=	Glutamin
R	=	Arg	=	Arginin
S	=	Ser	=	Serin
T	=	Thr	=	Threonin
V	=	Val	=	Valin
W	=	Trp	=	Tryptophan
Y	=	Tyr	=	Tyrosin

Beim Auftreten mehrerer Mutationen innerhalb desselben Protein-Moleküls wird dieses über die Summe der einzelnen Mutationen charakterisiert, wie zum Beispiel S3T + V4I + A188P + V193M + V199I.

Der Schutz gegenüber thermischer und chemischer Inaktivierung und die Verbesserung der Wasch- und Reinigungswirkung sowie der Hautverträglichkeit sind primäre Aufgaben, wenn man neue Proteasen für technische und gewerbliche Anwendungen entwickeln will. Eine Vielzahl von Enzymen, darunter auch Proteasen vom Subtilisin-Typ, wurden durch Zufallsmutagenese oder ortsspezifische Mutagenese entwickelt. Sie liefern einige Hinweise, wie man eine verbesserte thermische und chemische Stabilität auf rationalem Wege erreichen kann (D.A. Estell, T.P. Graycar und J.A. Wells (1985) J. Biol. Chem. 260, 6518-6521; M. Matsumura, W.J. Bechtel, M. Levitt und B.W. Matthews (1989) Proc. Natl. Sci. US 86, 6562-6566; M.W. Pantoliano, M. Whitlow, J.F. Wood, M.L. Rollence, B.C. Finzel, G.L. Gilliland, T.L. Poulos und P.N. Bryan (1988) Biochemistry 27, 8311-8317; A.J. Russell und A.R. Fersht (1987) Nature 328, 496-500; R.J. Siezen, W.M. De Vos, J.A.M. Leunissen, und B.W. Dijkstra (1991) Protein Eng. 4, 719-737; J.H. van Ee (1991) Chimicaoggi (7/8), 31-35; J.A. Wells und D.A. Estell (1988) Trends Biochem. Sci. 13, 291-287). Demgegenüber ist die Veränderung der enzymatischen Aktivität, insbesondere der Verbesserung oder Optimierung der Geschwindigkeit für einige Substrate, ein wesentlich komplexeres Problem. EP 0 260 105 offenbart die Herstellung

von Subtilisin-BPN'-Mutanten mit veränderten Verhältnissen von Umesterungsgeschwindigkeit zu Hydrolysegeschwindigkeit und nucleophilen Spezifitäten durch Verändern spezifischer Aminosäurereste innerhalb von 15 Å der katalytischen Triade. A.J. Russell und A.R. Fersht (1987) J. Mol. Biol. 193, 803-813, beschreiben die Isolierung einer Subtilisin-BPN'-Mutante (D099S), die eine Veränderung der Oberflächenladung im Abstand von 14 bis 15 Å vom aktiven Zentrum aufweist. Diese Substitution beeinflußt die pH-Abhängigkeit der katalytischen Reaktion des Subtilisins. Keine dieser Veröffentlichungen lehrt, ob die Veränderungen der Aminosäuren auch eine Veränderung der Hautverträglichkeit der Enzyme bewirken. EP 0 130 756, EP 0 247 647 und US 4 760 025 offenbaren ein Sättigungsmutationsverfahren, worin mindestens eine Mutation in das Subtilisin BPN' an den Aminosäureresten (BPN'-Numerierung) Asp32, Asn155, Tyr104, Met222, Gly166, His64, Ser221, Gly169, Glu156, Ser33, Phe189, Tyr217 und/oder Ala152 eingeführt wird. Unter Verwendung dieser Vorgehensweise werden mutierte Proteasen, die eine verbesserte oxidative Stabilität, eine veränderte Substratspezifität und/oder eine veränderte pH-Aktivität zeigen, erhalten. Diese Veröffentlichungen lehren auch, daß Mutationen im Bereich des aktiven Zentrums der Protease die Aktivität am meisten beinflussen. Jedoch offenbart keine dieser Schriften ein Verfahren, das es ermöglicht, vorherzusagen, ob und welche Veränderungen in der Aminosäuresequenz die Hautverträglichkeit von Proteasen verbessern.

Die meisten der Informationen über die katalytische Aktivität von Subtilisinen wurden bei Untersuchungen der Hydrolyse kleiner, gut definierter Peptidsubstrate gesammelt. Bis jetzt ist nur wenig über Interaktionen mit großen Proteinsubstraten bekannt. Dies gilt insbesondere für die Informationen zur Waschleistung von Proteasen, wenn deren Substrat an eine textile Oberfläche gebunden ist und die Katalyse in Gegenwart von mit dem Enzym wechselwirkenden Substanzen wie Bleichmitteln, Tensiden und Buildern stattfinden muß. Auch ist nichts über die Wechselwirkung der Proteasen mit den in Haut- und Haarpflegemitteln sowie Mundpflegemitteln üblicherweise enthaltenen Substanzen bekannt.

EP 0 328 229 offenbart die Isolierung und Charakterisierung von PB92 Subtilisin-Mutanten mit verbesserten Eigenschaften bei der Anwendung in Waschmitteln, basierend auf den Ergebnissen von Waschtests. Dieses Dokument lehrt, daß biochemische Eigenschaften keine verlässlichen Parameter sind, um die Enzymleistung bei der Wäsche

vorauszusagen. Dort vorgestellte Verfahren zur Auswahl von Mutationen beinhalten die Substitution von Aminosäuren durch andere Aminosäuren in der gleichen Kategorie (polar, unpolär, aromatisch, geladen, aliphatisch und neutral), die Substitution von polaren Aminosäuren wie Asparagin und Glutamin durch geladene Aminosäuren, und das Erhöhen des anionischen Charakters der Protease an den Mutationsstellen, die nicht zu den aktiven Zentren gehören. Es wird kein Verfahren beschrieben, mit welchem identifiziert werden kann, welche spezifischen Aminosäuren verändert werden sollten.

Es sind mehrere Patentanmeldungen bekannt, in denen Modifikationen von Subtilisin-Enzymen beschrieben werden, um deren Wirkungsweise in Waschmitteln zu verbessern, zum Beispiel die internationalen Patentanmeldungen WO 91/00345 und WO 92/11357.

Die europäische Patentanmeldung EP 0 571 049 offenbart bestimmte mutierte proteolytische Enzyme. Diese Enzyme sollen zu mindestens 70 % homolog sein mit der Aminosäure-Sequenz der PB92-Serin-Protease und sich von der PB92-Serin-Protease durch mindestens eine Aminosäure an den Positionen 99, 102, 116, 126, 127, 128, 130, 160, 203, 211 und/oder 212 unterscheiden. Die mutierte Protease wird durch Züchten eines Wirtstamms, welcher mit einem Expressionsvektor transformiert wurde, der eine DNA-Sequenz enthält und für die gewünschte mutierte Protease codiert, hergestellt.

In der nicht vorveröffentlichten internationalen Patentanmeldung WO 95/23221 werden mutierte Proteasen beschrieben, die als Zusatz zu Wasch- und Reinigungsmitteln deren Wirksamkeit verbessern.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, mutierte Proteasen zur Verfügung zu stellen, die gegenüber der ursprünglichen Protease verbesserte Hautverträglichkeiten aufweisen und in kosmetischen Produkten, insbesondere Körperreinigungs- und pflegemitteln sowie Mundpflegemitteln, eingesetzt werden können.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß insbesondere die in WO 95/23221 genannten mutierten Proteasen diese Forderung erfüllen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von mutierter Subtilisin-Protease in kosmetischen Produkten, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß die mutierte Subtilisin-Protease mindestens eine Mutation in ihrer Aminosäure-Sequenz enthält, die zu einer reduzierten positiven Ladung oder einer erhöhten negativen Ladung in der Nähe der an das Substrat gebundenen Region des Moleküls („Substratbindungsstelle“) führt.

Zu den kosmetischen Produkten, in denen die mutierte Protease erfindungsgemäß eingesetzt werden kann, sind insbesondere Körperreinigungs- und -pflegemittel sowie Mundpflegemittel zu nennen, wie zum Beispiel Seifen in fester und flüssiger Form, Peeling-Cremes, Hautcremes, Softcremes, Nährcremes, Sonnenschutzcremes, Nachtcremes, Hautöle, Pflegelotionen und Körper-Aerosole, Deodorants, Rasiercremes und Rasierschäume, Haarshampoos, Haarspülungen und Schaumbäder, Mundspülungen und Zahnpasten.

Die erfindungsgemäß zu verwendenden mutierten Proteasen zeigen überraschenderweise ein geringes Irritationspotential gegenüber der Haut und den Schleimhäuten und eignen sich demgemäß hervorragend zum Einsatz in den voranstehend genannten Produkten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der voranstehend genannten Proteasen zur Herstellung von Mitteln zur Haut-, Haar- und Körperpflege. Zur Herstellung dieser Mittel werden die einzelnen Komponenten in an sich bekannter Weise vermischt. Die Mittel können, insbesondere wenn sie lipophile Stoffe enthalten, sowohl als "Wasser-in-Öl" als auch "Öl-in-Wasser"- Emulsionen vorliegen und weitere übliche Hilfs- und Zusatzstoffe enthalten.

Die Mittel können neben den erfindungsgemäß eingesetzten Proteasen als wesentliche Bestandteile insbesondere Tenside, wie anionische, nichtionische, kationische, amphotere und/oder zwitterionische Tenside, enthalten.

Als Hilfs- und Zusatzstoffe eignen sich beispielsweise Emulgatoren, Ölkomponenten, Fette und Wachse, Verdickungsmittel, Überfettungsmittel, biogene Wirkstoffe, Filmbildner, Duftstoffe, Farbstoffe, Perglanzmittel, Konservierungsmittel und pH-Regulatoren.

Unter den üblichen Ölkomponenten sind Substanzen wie Paraffinöl, Pflanzenöle, Fettsäureester, Siliconöle, Dialkylether, Fettalkohole und Guerbetalkohole, Squalan und 2-Octyldodecanol zu nennen, während als Fette und Wachse beispielsweise Walrat, Bienenwachs, Montanwachs, Paraffin und Cetylstearylalkohol Verwendung finden.

Als Emulgatoren können beispielsweise eingesetzt werden: Sorbitanester, Monoglyceride, Polysorbate, Polyethylenglycolmono/difettsäureester, hochethoxylierte Fettsäureester sowie hochmolekulare Siliconverbindungen, wie zum Beispiel Dimethylpolysiloxane mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 10.000 bis 50.000.

Als Überfettungsmittel können Substanzen wie polyethoxylierte Lanolin-Derivate, Dicytin-Derivate und Fettsäurealkanolamide verwendet werden, wobei die letzteren gleichzeitig als Schaumstabilisatoren dienen.

Geeignete Verdickungsmittel sind beispielsweise Polysaccharide, insbesondere Xanthan-Gummi, Guar, Agar-Agar, Alginat und Tylosen, Carboxymethylcellulose und Hydroxyethylcellulose, ferner höher molekulare Polyethylenglykolmono- und -diester von Fettsäuren, Polyacrylate, Polyvinylalkohol und Polyvinylpyrrolidon sowie Elektrolyte wie Kochsalz und Ammoniumchlorid.

Unter biogenen Wirkstoffen sind beispielsweise Pflanzenextrakte, Eiweißhydrolysate und Vitaminkomplexe zu verstehen.

Gebräuchliche Filmbildner sind beispielsweise Polyvinylpyrrolidon, Vinylpyrrolidon-Vinylacetat-Copolymerisate, Polymere der Acrylsäurerreihe, quaternäre Cellulose-Derivate und ähnliche Verbindungen.

Als Konservierungsmittel eignen sich beispielsweise Formaldehyd-Lösungen, p-Hydroxybenzoësäureester oder Sorbinsäure.

Als Perglanzmittel kommen beispielsweise Glykoldistearinsäureester wie Ethylenglykoldistearat, aber auch Fettsäuremonoglykolester in Betracht.

Als Farbstoffe können die für kosmetische Zwecke geeigneten und zugelassenen Substanzen verwendet werden, wie sie beispielsweise in der Publikation „Kosmetische Farbmittel“ der Farbstoffkommission der deutschen Forschungsgemeinschaft, veröffentlicht im Verlag Chemie, Weinheim, 1984, zusammengestellt sind. Diese Farbstoffe werden üblicherweise in Konzentrationen von 0,001 bis 0,1 Gew.-%, bezogen auf die gesamte Mischung, eingesetzt.

Insbesondere in Cremes können, gegebenenfalls neben den bereits genannten Zusätzen, auch Antioxidantien, wie zum Beispiel Butylhydroxytoluol und Tocopherol, Feuchthaltemittel, wie zum Beispiel Glycerin, Sorbitol, 2-Pyrrolidin-5-carboxylat, Dibutylphthalat, Gelatine, Polyglycole mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 200 bis 600, pH-Puffersubstanzen, wie zum Beispiel das System Milchsäure/Triethanolamin oder Milchsäure/NaOH, milde Tenside, wie zum Beispiel Alkyloligoglucoside, Fettalkoholethersulfate, Fettsäureisethionate, -tauride und -sarcosinate, Ethercarbonsäuren, Sulfosuccinate, Eiweißhydrolysate beziehungsweise -fettsäurekondensate, Sulfotriglyceride, kurzkettige Glucamide, Phospholipide, Pflanzenextrakte, zum Beispiel von Aloe vera, Sonnenschutzmittel, wie zum Beispiel ultrafeines Titandioxid oder organische Stoffe wie p-Aminobenzoësäure und deren Ester, Ethylhexyl-p-methoxy-zimtsäureester, 2-Ethoxyethyl-p-methoxyzimtsäureester, Butylmethoxydibenzoylmethan und deren Mischungen sowie sogenannte Wirkstoffbeschleuniger, insbesondere etherische Öle, wie beispielsweise Eucalyptol, Menthol und ähnliche enthalten sein.

Um Proteasen in Mitteln der voranstehend beschriebenen Art einsetzen zu können, dürfen sie keine oder nur geringe Irritationen gegenüber der Haut beziehungsweise den Schleimhäuten hervorrufen.

Der ursprüngliche Proteasetyp, von welchem sich die gemäß der Erfindung zu verwendenden mutierten Proteasen ableiten, ist vorzugsweise eine oben beschriebene alkalische *Bacillus latus* Protease (BLAP), die aus dem Stamm DSM 5483 erhalten wird und 269 Aminosäureeinheiten, eine Molekulmasse von 26.823 Dalton und einen berechneten isoelektrischen Punkt von 9,7, bezogen auf pK-Standardwerte, aufweist. Das BLAP-Gen kann in bekannter Weise durch Isolieren der chromosomal DNA aus dem *B. latus*-Stamm DSM 5483, Herstellen von DNA-Proben mit einer Homologie gegenüber den

DNA-Sequenzen der für die *B. latus* Protease codierenden Regionen, Herstellen von Genom-Bibliotheken aus der isolierten chromosomal DNA und Auswählen der Bibliotheken für die interessierenden Gene durch Hybridisierung der Proben erhalten werden. Mutanten des genannten BLAP mit verbesserter Stabilität gegenüber thermischer Belastung und Tensiden wurden in der internationalen Patentanmeldung WO 94/21760 beschrieben.

Wie nun gefunden wurde, kann ein verringertes Irritationspotential gegenüber der Haut und den Schleimhäuten erzielt werden, wenn Aminosäure-Veränderungen innerhalb des Substratbindungsbereichs des Enzyms durchgeführt werden, die zu einer Erhöhung der negativen Ladung führen. Gemäß der vorliegenden Erfindung kann dies beispielsweise durch eine Vermehrung von negativ geladenen Aminosäureresten oder einer Reduktion von positiv geladenen Aminosäureresten im Substratbindungsbereich im Umkreis von 7 Å erfolgen, wobei die Substratbindungsstelle mit Hilfe eines gebundenen Substratmoleküls, wie zum Beispiel AAPF, festgestellt werden kann. Insbesondere Aminosäure-Veränderungen an den Positionen 99, 154 und 211 innerhalb der aus WO 94/21760 bekannten BLAP-Varianten M130 und M131 von *Bacillus latus* führen zu einem verringerten Irritationspotential gegenüber Haut und Schleimhäuten. Die Mutante M130 enthält vier Aminosäure-Veränderungen im Vergleich zu nativem BLAP: S3T, A188P, V193M und V199I. Die Mutante M131 enthält fünf Aminosäure-Veränderungen im Vergleich zu nativem BLAP: S3T, V4I, A188P, V193M und V199I. Die Aminosäure-Sequenz für die Protease M130 beziehungsweise M131 ist in der SEQ ID No.:2 beziehungsweise SEQ ID No.:1 der genannten internationalen Patentanmeldung WO 94/21760 wiedergegeben. M130 und M131 können als Basis für weitere Aminosäuren-Veränderungen dienen, um Proteasen mit verringertem Irritationspotential zu erhalten. Bevorzugte Proteasenmutanten zur erfindungsgemäßen Verwendung sind solche, die durch Ersatz mindestens einer Aminosäure der Proteasen M130 oder M131 erhalten werden, worin die Aminosäure ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Arginin an Position 99, Serin an Position 154 und Leucin an Position 211. Derartige Mutanten und ihre Herstellung sind in der internationalen Patentanmeldung WO 95/21221 offenbart und werden dort als F11 (S3T + R99S + A188P + V193M + V199I), F43 (S3T + V4I + R99G + A188P + V193M + V199I), F44 (S3T + V4I + R99A

+ A188P + V193M + V199I), F45 (S3T + V4I + R99S + A188P + V193M + V199I), F46 (S3T + V4I + S154E + A188P + V193M + V199I), F47 (S3T + V4I + S154D + A188P + V193M + V199I), F49 (S3T + V4I + A188P + V193M + V199I + L211D), F54 (S3T + V4I + R99G + A188P + V193 + V199I + L211D) und F55 (S3T + V4I + S154D + A188P + V193M + V199I + L211D) bezeichnet. Die proteolytische Aktivität kann in Anlehnung an die in Tenside 7 (1970), 125 beschriebene Methode durch eine diskontinuierliche Bestimmung unter Verwendung von Casein als Substrat wie folgt gemessen werden: Die Konzentrationen der Substrat-Lösung betragen 12 mg pro ml Casein (hergestellt gemäß Hammarsten; Lieferant: Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 2242) und 30 mM Tris in synthetischem Leitungswasser (wässrige Lösung von 0,029 % (Gew./V) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,014 % (Gew./V) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 0,021 % (Gew./V) NaHCO_3) mit einer Härte von 15 Grad dH (deutsche Härte). Die Substrat-Lösung wird auf 70° C erwärmt und der pH wird mit 0,1 N NaOH bei 50° C auf pH 8,5 eingestellt. Die Protease-Lösung wird mit 2 % (Gew./V) wasserfreiem Pentanatrium-Tripolyphosphat in synthetischem Leitungswasser hergestellt, wobei der pH mit Salzsäure auf 8,5 eingestellt wird. Zu 600 μl der Casein-Substrat-Lösung werden 200 μl der Enzym-Lösung zugegeben. Das Gemisch wird 15 Minuten bei 50° C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 600 μl 0,44 M Trichloressigsäure (TCA), 0,22 M Natriumacetat in 3 % (V/V) Essigsäure beendet. Nach Abkühlen auf Eis innerhalb von 15 Minuten wird das TCA-unlösliche Protein durch Zentrifugieren entfernt, ein Aliquot von 900 μl wird mit 300 μl 2 N NaOH gemischt und die Extinktion dieses Gemisches, das TCA-lösliche Peptide enthält, wird bei 290 nm aufgenommen. Kontrollwerte werden hergestellt durch Hinzufügen von 600 μl der TCA-Lösung zu 600 μl Casein-Lösung gefolgt von 200 μl Enzym-Lösung. Definitionsgemäß besitzt eine Protease-Lösung, die unter den Bedingungen dieses Versuchs eine Extinktionsänderung von 0,500 OD bei 290 nm hervorruft, eine Aktivität von 10 PE pro ml.

BeispieleBeispiel 1: Bestimmung des Irritationspotentials

Die Irritationspotentiale erfundungsgemäß einzusetzender Proteasen am Beispiel von F49 und zum Vergleich von BLAP wurden untersucht. Es wurde an Meerschweinchen im Rahmen von Dosisfindungsversuchen des Buehler-Tests bestimmt (E.V. Buehler, Arch. Dermatol. 1965, 91, 171-177). Hierzu wurde eine 10%ige Lösung der Protease auf die rasierte Haut topisch appliziert und mittels einer Bandage (Scotchkap®-Non-Woven-Patch, Handelsprodukt; Hersteller Minnesota Mining and Manufacturing Company) für sechs Stunden fixiert. 24, 48 und 72 Stunden nach der Entfernung der Bandagen wurden die betreffenden Hautpartien ausgewertet.

Diese Versuche wurden an jeweils vier Meerschweinchen (Stamm: "Pirbright white") durchgeführt, wobei pro Tier die Lösungen an mindestens zwei Applikationsstellen aufgebracht wurden. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen 2 und 3 wiedergegeben und stellen Mittelwerte über Erythem- und Ödembildung dar. Die Ergebnisse zeigen, daß die erfundungsgemäß einzusetzende mutierte Protease ein deutlich geringeres Irritationspotential zeigt als die unveränderte Protease BLAP.

In den Tabellen bedeuten

die Ziffern 0, 1 und 2 die Anzahl Hautbereiche an einem Tier, an denen Irritationen der Haut beobachtet wurden,

- s leichte Schorfbildung am Rand der behandelten Hautbereiche,
- a Schwellung

Tabelle 2: Epidemiale Applikation von F49

Tier Nr.	Körpergewicht an Tag - 5 (g)	Konzentration (w/w)	Aktivität (PE/ml)	Bewertung der Haut nach Entfernung der Bandage				Körpergewicht an Tag - 7 (g)
				Nach 24 Std. Erythem Ödem	Nach 48 Std. Erythem Ödem	Nach 72 Std. Erythem Ödem		
5	347	10,52	20000	1 0	2a 0	2 0	2a 0	2 359
		5,26	10000	1 0	1 0	0 0	1a 1a	0 0
6	391	10,52	20000	1 0	1 0	1 0	2 1a	2 403
		5,26	10000	1 0	0 0	1 0	1a 1a	0 0
7	400	2,63	5000	1 0	0 0	1 0	0 1	0 416
		1,31	2500	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
		0,52	1000	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
		0,26	500	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
8	379	2,63	5000	1 0	0 1	0 0	1a 0	0 393
		1,31	2500	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
		0,52	1000	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
		0,26	500	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0

Beobachtete systemische Symptome: keine

Tabelle 3: Epidermale Applikation von BLAP (Vergleich)

Tier Nr.	Körpergewicht an Tag - 5 (g)	Konzentration (w/w)	Aktivität (PE/ml)	Bewertung der Haut nach Entfernung der Bandage				Körpergewicht an Tag - 7 (g)
				Nach 24 Std.	Nach 48 Std.	Nach 72 Std.		
1	351	8,60	20000	Erythem 1a	Ödem 0	Erythem 2as	Ödem 2	355
		4,30	10000	1	0	1	0	
2	325	8,60	20000	Erythem 1a	Ödem 0	Erythem 2as	Ödem 2	345
		4,30	10000	1	0	1	0	
3	372	2,15	5000	Erythem 1	Ödem 0	Erythem 2	Ödem 1	368
		1,07	2500	1	0	0	0	
4	362	0,42	1000	Erythem 0	Ödem 0	Erythem 0	Ödem 0	377
		0,21	500	0	0	0	0	
		2,15	5000	Erythem 1	Ödem 0	Erythem 2	Ödem 2	0
		1,07	2500	0	0	1	0	
		0,42	1000	Erythem 0	Ödem 0	Erythem 1	Ödem 0	0
		0,21	500	0	0	0	0	

Patentansprüche

1. Verwendung von mutierter Protease vom Subtilisin-Typ, die mindestens eine Mutation in ihrer Aminosäure-Sequenz trägt, die zu einer reduzierten positiven Ladung oder einer erhöhten negativen Ladung in der Substrat-Bindungsregion des Moleküls führt, in kosmetischen Produkten.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich die mutierte Protease von alkalischer *Bacillus lentinus* Protease ableitet.
3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die mutierte Protease eine mutierte alkalische Protease M131 (S3T + V4I + A188P + V193M + V199I) oder eine mutierte alkalische Protease M130 (S3T + A188P + V193M + V199I) ist.
4. Verwendung nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Protease mindestens eine Mutation in ihrer Aminosäuresequenz ausgewählt aus den Positionen 99, 154 und 211 aufweist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest 99, Arginin, durch einen Glycin-, Alanin- oder Serinrest ersetzt ist.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest 154, Serin, durch einen Glutaminsäure- oder einen Asparaginsäurerest ersetzt ist.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest 211, Leucin, durch einen Glutaminsäure- oder einen Asparaginsäurerest ersetzt ist.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die mutierte Protease eine oder mehrere der Mutationen R99G, R99S, R99A, L211D, L211E, S154D, S154E aufweist.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die kosmetischen Produkte ausgewählt werden aus Seifen in fester und flüssiger Form, Hautcremes, Softcremes, Nährcremes, Sonnenschutzcremes, Nachtcremes, Hautölen, Pflegelotionen, Körper-Aerosolen, Deodorants, Rasiercremes, Rasierschäumen, Peelingcremes, Haarshampoos, Haarspülungen, Schaumbäder, Mundspülungen und Zahnpasten.
10. Verfahren zur Herstellung von kosmetischen Produkten, dadurch gekennzeichnet, daß man mutierte Protease vom Subtilisin-Typ, die mindestens eine Mutation an ihrer Aminosäure-Sequenz trägt, die zu einer reduzierten positiven Ladung oder einer erhöhten negativen Ladung in der Substrat-Bindungsregion des Moleküls führt, mit weiteren Inhaltsstoffen kosmetischer Produkte vermischt.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als weitere Inhaltsstoffe anionische, nichtionische, kationische, amphotere beziehungsweise zwitterionische Tenside, Emulgatoren, Ölkomponenten, Fette und Wachse, Verdickungsmittel, Überfettungsmittel, biogene Wirkstoffe, Filmbildner, Duftstoffe, Farbstoffe, Perglanzmittel, Konservierungsmittel und/oder pH-Regulatoren eingesetzt werden.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 96/03589

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K7/48 A61K7/06 A61K7/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 10591 A (PROCTER & GAMBLE) 20 April 1995 see claims 1,2,9,24 see page 2, line 19 - page 3, line 8 see page 7, line 1-28 ---	1,2,4,5, 8-11
A	WO 92 21760 A (COGNIS) 10 December 1992 see claims 1-3 see page 1, line 17-23 see page 14, line 9 - page 15, line 36 ---	1-3
A	WO 94 02618 A (GIST-BROCADES) 3 February 1994 see claims 1-3,10 ---	1-8 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search

29 January 1997

Date of mailing of the international search report

05.02.97

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Peeters, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational Application No.
PCT/EP 96/03589**C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 571 049 A (GIST-BROCADES) 24 November 1993 cited in the application see claims 1,10 -----	1,2,4
2		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/03589

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9510591	20-04-95	AU-A-	8079794	04-05-95
		CA-A-	2173105	20-04-95
		CN-A-	1137289	04-12-96
		EP-A-	0723579	31-07-96
		ZA-A-	9408067	06-06-95
		AU-A-	1253695	04-05-95
		AU-A-	2294495	29-11-95
		CA-A-	2173106	20-04-95
		CN-A-	1137288	04-12-96
		EP-A-	0723580	31-07-96
		WO-A-	9510592	20-04-95
		WO-A-	9530011	09-11-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9221760	10-12-92	US-A-	5340735	23-08-94
		EP-A-	0590012	06-04-94
		JP-T-	6508264	22-09-94
		US-A-	5500364	19-03-96
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9402618	03-02-94	AU-A-	4700693	14-02-94
		CA-A-	2139928	03-02-94
		EP-A-	0717778	26-06-96
		FI-A-	950168	10-03-95
		JP-T-	7508887	05-10-95
		PL-A-	307132	02-05-95
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A-0571049	24-11-93	AU-B-	629814	15-10-92
		AU-A-	3050189	06-09-89
		BG-B-	60566	28-08-95
		CN-A-	1036602	25-10-89
		DE-D-	68912359	03-03-94
		DE-T-	68912359	09-06-94
		EP-A-	0328229	16-08-89
		ES-T-	2061929	16-12-94
		IE-B-	63248	05-04-95
		JP-T-	2503986	22-11-90
		LT-A,B	1650	25-07-95
		WO-A-	8907642	24-08-89
		PT-B-	89702	29-04-94
		US-A-	5336611	09-08-94
		US-A-	5324653	28-06-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/03589

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K7/48 A61K7/06 A61K7/28

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiert Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 10591 A (PROCTER & GAMBLE) 20.April 1995 siehe Ansprüche 1,2,9,24 siehe Seite 2, Zeile 19 - Seite 3, Zeile 8 siehe Seite 7, Zeile 1-28 ---	1,2,4,5, 8-11
A	WO 92 21760 A (COGNIS) 10.Dezember 1992 siehe Ansprüche 1-3 siehe Seite 1, Zeile 17-23 siehe Seite 14, Zeile 9 - Seite 15, Zeile 36 ---	1-3
A	WO 94 02618 A (GIST-BROCADES) 3.Februar 1994 siehe Ansprüche 1-3,10 ---	1-8
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *' A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besondere Bedeutung anzusehen ist
- *' E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *' L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *' O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *' P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *' T' Später Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *' X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *' Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *' &' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 29.Januar 1997	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 05.02.97
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Peeters, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/03589

C.(Fortsetzung) **ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der im Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 571 049 A (GIST-BROCADES) 24.November 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1,10 -----	1,2,4

2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/03589

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9510591	20-04-95	AU-A- 8079794 CA-A- 2173105 CN-A- 1137289 EP-A- 0723579 ZA-A- 9408067 AU-A- 1253695 AU-A- 2294495 CA-A- 2173106 CN-A- 1137288 EP-A- 0723580 WO-A- 9510592 WO-A- 9530011	04-05-95 20-04-95 04-12-96 31-07-96 06-06-95 04-05-95 29-11-95 20-04-95 04-12-96 31-07-96 20-04-95 09-11-95
WO-A-9221760	10-12-92	US-A- 5340735 EP-A- 0590012 JP-T- 6508264 US-A- 5500364	23-08-94 06-04-94 22-09-94 19-03-96
WO-A-9402618	03-02-94	AU-A- 4700693 CA-A- 2139928 EP-A- 0717778 FI-A- 950168 JP-T- 7508887 PL-A- 307132	14-02-94 03-02-94 26-06-96 10-03-95 05-10-95 02-05-95
EP-A-0571049	24-11-93	AU-B- 629814 AU-A- 3050189 BG-B- 60566 CN-A- 1036602 DE-D- 68912359 DE-T- 68912359 EP-A- 0328229 ES-T- 2061929 IE-B- 63248 JP-T- 2503986 LT-A,B 1650 WO-A- 8907642 PT-B- 89702 US-A- 5336611 US-A- 5324653	15-10-92 06-09-89 28-08-95 25-10-89 03-03-94 09-06-94 16-08-89 16-12-94 05-04-95 22-11-90 25-07-95 24-08-89 29-04-94 09-08-94 28-06-94